

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2017

課題番号：24580046

研究課題名(和文) 果樹における染色体解析のゲノム研究への適用

研究課題名(英文) Application of chromosome analysis on genome studies in fruit trees

研究代表者

山本 雅史 (YAMAMOTO, Masashi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：00305161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： ナシにおいて原品種と同じ遺伝子型を備える葉を材料とした染色体分析法を開発した。幼葉を材料とした酵素解離法による最適条件は、酵素組成が4%セルラーゼオノズカRS、1.5%マセロザイムR200および0.3%ペクトリアーゼY-23、37℃、60～75分であった。ニホンナシ黒斑病のナシにおける本病因遺伝子座の染色体上の位置を検出した。この領域を含むBACクローンをを用いたFISHを行ったところ、2本の染色体の端部にシグナルが観察できた。ナシと同じくバラ科ナシ亜科に属するリンゴの染色体構成をナシと比較した。両者の染色体構成は極めて類似していた。

研究成果の概要(英文)： A chromosome preparation method using young leaves of pear was developed. For enzymatic maceration/airdrying (EMA), enzyme mixture containing 4% Cellulase Onozuka RS, 1.5% Macerozyme R200 (Yakult), 0.3% Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co., Ltd.), at 37 °C for 60-75 min was optimum for chromosome preparation. Black spot disease is one of the most harmful diseases in Japanese pear cultivation. In the present study, the locations of black spot disease resistance/susceptibility related genome regions were studied by fluorescence in situ hybridization using BAC clone (BAC-FISH) on Japanese pear chromosomes. Black spot disease-related genome regions were detected in telomeric positions of two medium size chromosomes. Pear and apple belong to the subfamily Spiraeoideae, tribe Pyreae. The chromosome configurations of both genera were quite similar. Syntenic relationships between the apple and pear genomes are supported by the chromosome configuration in the present study.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 ナシ 染色体 核型分析 ゲノム FISH BAC-FISH バラ科

1. 研究開始当初の背景

果実には健康維持・増進効果を備える種々の機能性物質が存在しており、健やかな生活を送る上で不可欠の食品である。そのため、機能性に優れ、高品質で栽培容易な新品種の開発が目標とされている。しかし、果樹は遺伝的にヘテロ性が強く、幼若期間が長いこと、従来の育種法の効率は低く、より優れた育種法の開発が求められている。

一方、近年のゲノム研究の進展は著しく、イネにおける全ゲノムの解析は、食糧生産技術開発における新たな展開を可能にした。次世代シーケンサーの誕生等、ゲノム研究環境は加速度的に進展しており、果樹においてもこの数年で、カンキツ、リンゴ、ブドウ等の全ゲノム情報が公開され始めた。我が国においてもナシについてのゲノム研究が続けられてきており、重要形質に関する遺伝子の解析等の分野で成果をあげている(Terakami ら, 2007)。連鎖地図作成においては、ナシで染色体基本数 17 に収束する標準連鎖地図を世界初で作製した(Yamamoto ら, 2007)。

ゲノム研究の蓄積のあるイネゲノム研究や医学分野でのヒトゲノム研究では、遺伝子だけを研究対象とするのではなく、遺伝子の担体である染色体、および染色体上での遺伝子の解析も進んでいる。ある種の特性や疾病は染色体構造の変化が原因となっている場合も多く、遺伝子だけでなく染色体を解明することはゲノム研究の深化にとって極めて重要である。ヒトでは多色蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)により全 23 対の染色体が識別可能であり、イネでは染色体構造や染色体と遺伝子の関係が解明されている(Ohmido ら, 1998)。しかし、果樹類ではゲノム研究としての染色体研究が遅れていた。

2. 研究の目的

本研究はナシにおけるゲノム研究を利用した新品種開発技術の開発を目的として、その染色体の構造解明や、染色体上における遺伝子の位置を決定する。既にナシにおける良好な染色体標本作製技術は確立済みであり(Yamamoto ら, 2010)、その技術を基礎として研究を進める。

特に、原品種と同一の遺伝子型を備える植物の栄養体からの染色体標本の作製法の開発、ナシにおける重要遺伝子であるニホンナシ黒斑病抵抗性遺伝子の染色体上での位置の決定、ナシが属するバラ科ナシ亜科の染色体構成の特徴を解明することを主眼とした。

これらの成果によってゲノム研究と染色体研究の融合が可能になることは、交雑育種、倍数性育種および突然変異育種における染色体の挙動を解明するうえで重要な役割を果たす。また、ナシのゲノム構造の理解も大きく進展し、将来のデザイン育種、染色体工学への道を開くものである。

3. 研究の方法

(1) 鹿児島大学農学部(鹿児島市)において露地栽培している鉢植えの‘幸水’(*Pyrus pyrifolia*)を供試した。4月に展葉前の幼葉を採取した。葉は“短”(約1cm)と“長”(約2cm)に区分した。葉は採取後直ちに10の2mM、8-ハイドロキシキノリンで4時間前処理し、メタノール:酢酸(3:1)で固定した。酵素処理の際、“長”の葉は上部と下部に分けた。従って、植物材料は“短”、“長”(上部)および“長”(下部)の3種類となった。酵素処理においては約2mm²に切り取った葉片を酵素液に浸漬した。酵素組成は4%セルラーゼオノズカRS、1.5%マセロザイムR200および0.3%ペクトリアーゼY-23で、処理温度は37である。酵素処理時間は45、60、75および90分の4区を設けた。染色体標本はギムザ染色を行い、スライドガラス上における良好(34本の染色体が確認できて、細胞質がほとんど無いもの)な染色体標本数を計測した。

続いて、コムギ由来の18S-5.8S-25SrDNAをプローブとしたFISHを実施した。rDNAはニックトランスレーション法によってピオチン標識し、フルオレセイン(FITC)-アビジン結合体によって検出した。染色体はDAPIで対比染色した。DAPIおよびFITCはそれぞれUVおよびB励起で観察した。

(2) ‘おさゴールド’(*Pyrus pyrifolia*)の自殖実生を供試した。種子をシャーレに播種し、暗黒下で発根させた実生根端を材料とした。材料は採取後、直ちに10の2mM、8-ハイドロキシキノリンで4時間前処理した。染色体標本は酵素解離法により作成した。酵素の組成、濃度、処理時間等は以下の通りである。4%セルラーゼオノズカRSおよび1%ペクトリアーゼY-23で37、180分。ギムザ染色で染色体像の位置を確認した後、脱染してFISHに用いた。

プローブとして用いたBACクローンは、‘巾着’のBACライブラリーから単離され、ニホンナシ黒斑病原因遺伝子領域を含み、長さは約150kbである。BACクローンはニックトランスレーション法によってピオチン標識し、フルオレセイン(FITC)-アビジン結合体によって検出した。染色体はDAPIで対比染色した。DAPIおよびFITCはそれぞれUVおよびB励起で観察した。このBAC-FISHの実施に際しては、‘豊水’の葉から抽出したゲノムDNAをブロッキングDNAとして用いた。続いてコムギ由来の18S-5.8S-25SrDNAを用いたFISHを実施した。18S-5.8S-25SrDNAはニックトランスレーション法によってジゴキシゲニン標識し、ローダミン/テキサスレッド-抗ジゴキシゲニン結合体によって検出した。対比染色のDAPIおよびローダミン/テキサスレッドはそれぞれUVおよびG励起で観察した。

(3) ‘千秋’ (*Malus × domestica*)の自殖実生を供試した。種子をシャーレに播種し、暗黒下で発根させた実生根端を材料とした。材料は採取後、直ちに 10 の 2mM、8 - ハイドロキシキノリンで 4 時間前処理した。染色体標本は酵素解離法により作成した。酵素の組成、濃度、処理時間等は以下の通りである。4%セルラーゼオノズカ RS および 1%ペクトリアーゼ Y-23 で 37 、 180 分。ギムザ染色で染色体像の位置を確認した後、脱染して FISH に用いた。

続いて、コムギ由来の 18S-5.8S-25SrDNA およびナシ DNA から PCR によって得られた 5SrDNA をプローブとした FISH を実施した。rDNA はニックトランスレーション法によってピオチン標識し、フルオレセイン (FITC) - アビジン結合体によって検出した。染色体は DAPI で対比染色した。DAPI および FITC はそれぞれ UV および B 励起で観察した。

4. 研究成果

(1) 葉の材料および酵素処理時間の異なる 12 区全てで良好な染色体像が確認できた(表 1)。最も染色体数が多かったのは“長”(下部)・45 分区の 12.3 個、少なかったのは“長”(下部)・90 分区の 4.7 個であった。‘おさゴールド’ 自殖幼若実生根端では約 15 個の染色体像が確認されており、幼葉を材料とした場合、やや少なかった。45 分区以外では観察された染色体像数は、“短”で多く、“長”(下部)で少ない傾向にあった。酵素処理時間では 45~70 分までは染色体像数に顕著な差異は認められなかったが、90 分区は他区と比較して染色体像数が少なかった。これは、90 分区では酵素処理時間が長すぎることで、一部の染色体が流失したためだと考えられた。また、45 分区では染色体像の背景に細胞質が残存し、蛍光染色や FISH に不適と考えられる染色体像が散見された。これらのことから、展葉前の約 1~2cm の幼葉を材料として、前述の酵素組成および温度で 60~75 分処理することが適切であると考えられた。

表 1 ‘幸水’において材料の幼葉条件および酵素処理時間と得られた染色体像数との関係

材料	スライドガラス当たりの染色体標本数(個)			
	酵素処理時間			
	45分	60分	75分	90分
短	10.5	10.7	10.7	6.0
長(上部)	9.5	7.3	8.0	6.0
長(下部)	12.3	6.7	6.7	4.7

上記の条件で作製した染色体標本を用いて 18S-5.8S-25S rDNA 遺伝子の FISH を実施すると、rDNA 遺伝子は、6 本の染色体の端部に確認できた。これは幼若実生の根端由来の染色体標本における結果(Yamamoto ら、2010、2012)と一致した。

(2) ブロッキング DNA を用いることなく BAC-FISH を実施すると、多数のシグナルが観察された。これは BAC クローンに含まれる反復配列が多数の染色体領域にハイブリダイズした結果によるものと考えられた。不要なシグナルの出現を防止するため、標識していないナシのゲノム DNA をブロッキング DNA として BAC-FISH を行った。ブロッキング DNA の量はプローブの 10~50 倍とした。その結果、ブロッキング DNA 量が多くなるに従い出現するシグナルは減少し、明瞭な 2 個のシグナルが検出できる割合が増加した。しかし、ブロッキング DNA が 10 倍量であってもシグナルが 2 個の場合もあった。2 個のシグナルは 2 本の染色体の端部に観察された(図 1)。ニホンナシ黒斑病原因遺伝子座はナシ第 11 連鎖群の上部末端に座乗することが解明されており(Terakami ら、2007)、この 2 個のシグナルの染色体上の位置と一致した。続いて、同じ染色体を用いて FISH により 18S-5.8S-25SrDNA を検出したところ、既報(Yamamoto ら、2010、2012)同様 6 個のシグナルが出現した。18S-5.8S-25SrDNA のシグナルとニホンナシ黒斑病原因遺伝子領域のシグナルは異なる染色体上に検出された。

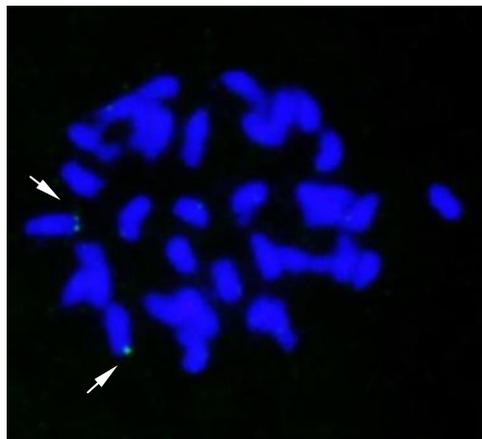


図 1 ‘おさゴールド’における黒斑病原因遺伝子領域の BAC-FISH 像

以上のように、本研究において BAC-FISH によるニホンナシ黒斑病原因遺伝子領域の可視化に成功した。これはナシにおける重要遺伝子の染色体上での位置を解明しただけでなく、連鎖群に対応する染色体を明らかにした初めての成果である。

(3) リンゴでは 18S-5.8S-25SrDNA は 8 か所に確認できた。いずれも染色体の端部に検出された。5SrDNA は動原体部 2 か所に認められた。これをリンゴ同様バラ科ナシ亜科に属するナシの染色体と比較した。ナシでは 18S-5.8S-25SrDNA は、染色体端部 6 か所に認められ、リンゴとは若干異なった。5SrDNA はナシでもリンゴ同様に動原体部 2 か所に認め

られた。ナシ、リンゴともに、18S-5.8S-5SrDNAと5SrDNAが座上する染色体は異なった。各染色体の長さ、rDNA 遺伝子座からナシとリンゴの染色体構成を比較したところ、2か所の18S-5.8S-25SrDNAの有無を除くと両者は極めて類似していた(表2)。このことから、ナシとリンゴとのゲノムの類似性を染色体面からも確認できた。これはゲノム研究の結果(Yamamotoら, 2007)と一致した。

表2 リンゴとニホンナシの染色体の比較

リンゴ '千秋'		ニホンナシ 'おさゴールド' ^{a)}	
染色体	相対長(%)	染色体	相対長(%)
18S-5.8S-25S rDNA が検出される染色体			
1	4.3		
2	3.9		
3	3.7	1	3.6
4	3.5	2	3.5
5	3.2	3	3.1
6	2.9	4	2.9
7	2.7	5	2.6
8	2.4	6	2.5
5S rDNA が検出される染色体			
9	2.6	7	2.6
10	2.3	8	2.5
rDNA 遺伝子座の無い染色体			
11	4.4	9	4.0
12	3.8	10	3.8
13	3.6	11	3.7
14	3.3	12	3.5
15	3.3	13	3.4
16	3.2	14	3.3
17	3.2	15	3.2
18	3.1	16	3.1
19	3.0	17	3.1
20	2.9	18	3.0
21	2.9	19	3.0
22	2.8	20	3.0
23	2.8	21	2.9
24	2.7	22	2.9
25	2.7	23	2.8
26	2.6	24	2.8
27	2.6	25	2.8
28	2.5	26	2.7
29	2.5	27	2.7
30	2.4	28	2.6
31	2.3	29	2.6
32	2.2	30	2.5
33	2.0	31	2.5
34	1.8	32	2.4
		33	2.3
		34	2.0

^{a)} Yamamotoら (2012)を修正

<引用文献>

Ohmido, N., Y. Akiyama and K. Fukui, Physical mapping of unique nucleotide

sequences on identified rice chromosomes. *Plant Mol. Biol.* 38, 1998, 1043-1052

Terakami, S., Y. Adachi, H. Iketani, Y. Sato, Y. Sawamura, N. Takada, C. Nishitani and T. Yamamoto, Genetic mapping of genes for susceptibility to black spot disease in Japanese pears. *Genome* 50, 2007, 733-741

Yamamoto, M., S. Terakami, T. Yamamoto, N. Takada, T. Kubo and S. Tominaga, Detection of the ribosomal RNA gene in pear (*Pyrus* spp.) using fluorescence *in situ* hybridization. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79, 2010, 335-339

Yamamoto, M., N. Takada, T. Yamamoto, S. Terakami, N. Shigeta, T. Kubo and S. Tominaga, Fluorescent staining and fluorescence *in situ* hybridization of rDNA of chromosomes in pear (*Pyrus* spp.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 81, 2012, 35-40

Yamamoto, T., T. Kimura, S. Terakami, C. Nishitani, Y. Sawamura, T. Saito, K. Kotobuki and T. Hayashi, Integrated reference genetic linkage maps of pear based on SSR and AFLP markers. *Breed. Sci.* 57, 2007, 321-329

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yamamoto, M., Moriya, S. and Yamamoto, T.: Detection of ribosomal RNA genes in apple (*Malus × domestica*) using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Science*, 査読有 19(1-4), 2016, 33-36, <https://doi.org/10.11352/scr.19.33>

Yamamoto, M., Terakami, S., Takada, N. and Yamamoto, T. Physical mapping of black spot disease resistance / susceptibility-related genome regions in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) by BAC-FISH. *Breeding Science*, 査読有 66(3), 2016, pp. 444-449, DOI:10.1270/jsbbs.15085

Yamamoto, M., Terakami, S. and Yamamoto, T. Enzymatic maceration / air-drying method for chromosome observations in the young leaf of pear *Chromosome Science*, 査読有 18(1-2), 2015, pp. 29-32, <https://doi.org/10.11352/scr.18.29>

[学会発表](計3件)

山本 雅史, 寺上 伸吾, 山本 俊哉, 酵素解離空気乾燥法によるナシ (*Pyrus* spp.)

幼葉からの染色体標本の作製，園芸学会
平成 26 年度秋季大会，2014 年

Masashi Yamamoto, Shingo Terakami,
Toshiya Yamamoto, Physical mapping of
black spot disease resistance /
susceptibility-related genome region
in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) by
BAC-FISH, 29th International
Horticultural Congress, 2014 年

山本雅史、寺上伸吾、高田教臣、山本俊
哉，BAC-FISH によるニホンナシ黒斑病原
因遺伝子領域の可視化，園芸学会平成 25
年度春季大会，2013 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅史 (YAMAMOTO, Masashi)
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授
研究者番号：00305161

(2) 研究分担者

高田 教臣 (TAKADA, Norio)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員
研究者番号：50355369

(3) 研究分担者

山本 俊哉 (YAMAMOTO, Toshiya)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・果樹茶業研究部門・ユニット長
研究者番号：60355360

(4) 研究分担者

清水 徳朗 (SHIMIZU, Tokuro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員
研究者番号：90355404